

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/11, 5/10, 1/19, 1/21,</b> <b>A01H 1/00, 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/04022</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 28. Januar 1999 (28.01.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/04346  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 13. Juli 1998 (13.07.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 30 535.0      16. Juli 1997 (16.07.97)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ROHDE, Wolfgang [DE/DE]; Untergasse 29, D-35418 Buseck (DE). BECKER, Dieter [DE/DE]; Stuppstrasse 14, D-50823 Köln (DE). RANGLES, John, W. [AU/AU]; 13 Spencer Street, Stirling, S.A. 5152 (AU). HEHN, Alain [FR/DE]; Burgstrasse 132, D-51103 Köln (DE). SALAMINI, Francesco [IT/DE]; Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> WIBBELMANN, Jobst; Wuesthoff & Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, D-81541 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> SPECIAL VIRUS DNA FRAGMENTS AND THEIR USE AS PROMOTER  <b>(54) Bezeichnung:</b> SPEZIELLE VIRUS-DNA-FRAGMENTE UND IHRE VERWENDUNG ALS PROMOTOR  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to the characterization and use of powerful viral promoters for expressing genes, especially in plants. The invention is based on the surprising discovery that special DNA fragments derived from CFDV-DNA (coconut foliar decay virus DNA), which feature the stem-loop structure but not the translation start(s) for the open reading frames ORF1 and/or ORF2, have a distinctly higher promoter activity in plants than promoters derived from CFDV-DNA which do not correspond to these requirements.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Beschrieben wird die Charakterisierung und Verwendung starker viraler Promotoren zur Expression von Genen insbesondere in Pflanzen. Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß spezielle, von der CFDV-DNA (coconut foliar decay virus DNA) abgeleitete DNA-Fragmente, die die "stem-loop"-Struktur, nicht jedoch den oder die Translationsstart(s) für die offenen Leseraster ORF1 und/oder ORF2 umfassen, eine deutlich höhere Promotoraktivität in Pflanzen aufweisen als von CFDV-DNA abgeleitete Promotoren, die diesen Maßgaben nicht entsprechen.		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Spezielle Virus-DNA-Fragmente und ihre Verwendung als Promotor

Es ist allgemein bekannt, daß sich mittels gentechnologischer Arbeitstechniken gezielt einzelne Gene in das Genom von Lebewesen, wie Mikroorganismen, Hefen oder Pflanzen, übertragen lassen. Diese als Transformation oder bei höheren Zellen auch als Transfection bekannte Technik wird routinemäßig auf verschiedenen Wegen durchgeführt, z.B. durch „particle gun bombardment“ (vgl. M.E. Fromm, F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas und T.M. Klein: „Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants“, Bio/Technology 8: 833-839, 1990), „nackten DNA-Transfer“ (vgl. P. Meyer, I. Heidmann, G. Forkmann und H. Saedler: „A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene“, Nature 330: 677-678, 1987) oder durch Agrobacterium-vermittelte stabile Integration von Genen oder Genabschnitten in das Genom einer Empfängerpflanze. Als Alternative zur chromosomalen Integration von Fremdgenen können z.B. extrachromosomal replizierende Vektoren benutzt werden, um Fremdgene ohne Integration in einem gewünschten Organismus zu exprimieren. Für Pflanzen stehen hierfür beispielsweise extrachromosomal replizierende Vektoren zur Verfügung, die aus Pflanzenviren entwickelt wurden (vgl. z.B. J. W. Davies und J. Stanley: „Geminivirus genes and vectors“, Trends Genet. 5: 77-81, 1989). Die in den gewählten Organismen zu exprimierenden Fremdgene müssen zu diesem Zweck unter die Kontrolle von für diesen Organismus geeigneten Regulationssignalen (Promotor, Terminator) gebracht werden, die entweder für eine konstitutive, gewebe- und/oder entwicklungsspezifische Transkription sorgen. Außerdem ist es wünschenswert, durch Verwendung eines

starken Promotors eine erhöhte mRNA-Synthese des Fremdgens zu bewirken.

Ein bekannter Promotor für Pflanzen, der die Anforderung an einen starken, konstitutiven Promotor erfüllt und daher vorwiegend für die Pflanzentransformation eingesetzt wird (vgl. R. Walden: „Genetic Transformation in Plants“, Open University Press, Milton Keynes, 1988) ist der 35S-RNA-Promotor des cauliflower mosaic virus (CaMV).

Nachteilig an dem bekannten CaMV 35S-Promotor ist seine geringe Aktivität in Monokotyledonen und im Phloemgewebe.

In dem deutschen Patent DE 43 06 832 der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften sowie in Rohde et al., Plant Molecular Biology 27: 623-628, 1995, wurde die Verwendung einer aus dem die Kokospalme Cocos nucifera befallenden Virus CFDV (coconut foliar decay virus) stammenden DNA, deren Struktur in den Figuren 1, 3A und 3B der Patentschrift dargestellt ist, als viraler phloemspezifischer Promotor zur gewebespezifischen Expression von Genen in transgenen Pflanzen beschrieben.

Das CFDV-Virus ist im vaskulären System der Pflanze lokalisiert (vgl. J.W. Randles et al.: „Localization of coconut foliar decay virus in coconut palm“, Ann. Appl. Biology 1992, 601-617). Eine mit den Krankheitssymptomen und dem Auftreten von Viruspartikeln assoziierte DNA war bereits früher kloniert, sequenziert und ihre Struktur bestimmt worden (vgl. W. Rohde et al.: „Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus“, Virology 176: 648-651, 1990). CFDV ist ein virales Phytopathogen mit einem Genom aus einzelsträngiger, zirkulärer, kovalent geschlossener DNA. In Rohde et al., Virology 176: 648-651, 1990, wurden ein DNA-Molekül des CFDV mit einer Größe von 1291 Nukleotiden sowie Deletionsmutanten davon beschrieben. CFDV ist kein Vertreter der Geminivirus-Gruppe, sondern bildet vermutlich den Prototyp der DNA-Virusgruppe der „Circoviren“.

Für die Phloemspezifität dieses Virus könnten verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Für PLRV (potato leafroll virus) z.B., einen Vertreter der Luteovirus-Gruppe, konnte gezeigt werden, daß eine Suppressor-tRNA, auf die das Virus für seine Genexpression angewiesen ist, nur im Phloem vorhanden ist und dadurch die Virusausbreitung über dieses Gewebe hinaus verhindert (Rohde et al., unveröffentlichte Daten).

Aufgabe der Erfindung ist es, einen gegenüber den genannten Promotoren stärkeren Promotor bereitzustellen, der sich insbesondere zur gewebespezifischen Expression von Genen in transgenen Pflanzen eignet und sowohl in Monokotyledonen als auch in Dikotyledonen wie auch im Phloemgewebe aktiv ist.

Es wurde gefunden, daß die gestellte Aufgabe mit speziellen Virus-DNA-Fragmenten gelöst werden kann, die von der DNA des CFDV-Virus in der in Anspruch 1 angegebenen Weise abgeleitet sind.

Gegenstand der Erfindung sind demzufolge die in den Ansprüchen gekennzeichneten Virus-DNA-Fragmente und deren Verwendung als Promotoren.

Überraschenderweise wurde herausgefunden, daß die sogenannte „stem-loop“-Struktur, die allgemein nur als notwendiges Element für die Replikation von CFDV und den Geminiviren angesehen wird, einen entscheidenden Einfluß auf die Transkription ausübt. So sind Konstrukte für die transiente Expression eines Reportergens in Kartoffelprotoplasten nur dann aktiv, wenn die „stem-loop“-Struktur erhalten ist. Darüberhinaus wurde gefunden, daß die Anwesenheit des oder der Translationsstart(s) für die beiden offenen CFDV-Leseraster ORF1 und/oder ORF2 die Translation eines Reportergens negativ beeinflusst.

Die CFDV-Fragmente entsprechend der Erfindung sind dementsprechend durch die vollständige „stem-loop“-Struktur und das Fehlen des oder der Translationsstart(s) für die offenen Leseraster ORF1 und/oder ORF2 des CFDV gekennzeichnet.

Bezogen auf das 5'-Ende der aus der Spaltung der zirkulären DNA des CFDV mit der Restriktionsendonuklease XhoI resul-

tierenden linearisierten DNA als Position 1 umfaßt die „stem-loop“-Struktur die Nukleotide 941 bis 971; die offenen CFDV-Leseraster ORF1 und ORF2 umfassen die Nukleotide 1004 bis 583 bzw. 1215 bis 383.

Zur Herstellung erfindungsgemäßer CFDV-DNA-Fragmente bedient man sich dem Fachmann wohl bekannter Techniken, wie beispielsweise geeigneter Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen auf der CFDV-DNA oder der Polymerase-Kettenreaktionstechnik, die es ermöglicht, mittels spezifischer Primer CFDV-DNA-Fragmente der gewünschten Länge ausgehend von einem Vollängen-CFDV-DNA-Konstrukt zu amplifizieren. Hierzu werden auf an sich bekannte Weise die Primer entsprechend dem gewünschten CFDV-Fragment anhand der von W. Rohde et al. in Virology 176: 648-651, 1990 beschriebenen Nukleotidsequenz des CFDV-Virus und genauer der Nukleotidsequenzen im Bereich der 5'- bzw. 3'-Enden des gewünschten Fragments synthetisiert.

Insbesondere bevorzugte erfindungsgemäße CFDV-DNA-Fragmente sind die DNA-Fragmente mit den Nukleotiden 211 bis 991, 409 bis 991, 611 bis 991 oder 711 bis 991.

Im Vergleich zu den in dem deutschen Patent DE 43 06 832 beschriebenen Promotoren weisen die neuen Konstrukte überraschenderweise eine bis zu 4-fache Steigerung der Aktivität, im Vergleich zu dem CaMV 35S-Promotor eine bis zu 2-fach höhere Aktivität in Pflanzenzellen auf. Dabei wird insbesondere eine starke und spezifische Expression von Genen unter der Kontrolle dieser erfindungsgemäßen Promotoren im Phloemgewebe beobachtet. Dementsprechend ist ein wichtiger Anwendungsbereich der Erfindung beispielsweise die phloemspezifische Expression von luteoviralen Genen mit dem Ziel, virusresistente Pflanzen zu schaffen. Luteoviren, wie z.B. PLRV (potato leafroll virus) sind phloemspezifisch replizierende Viren und der bislang u.a. verwendete CaMV 35S-Promotor zeigt nur schwache Aktivität im Phloemgewebe.

Ein weiterer überraschender Befund ist die Tatsache, daß erfindungsgemäße CFDV-DNA-Fragmente auch in Bakterien eine deutlich höhere Aktivität aufweisen als der gleichfalls in Bakterien aktive CaMV 35S-Promotor (Assaad und Signer, Molecular and General Genetics 223: 517-520, 1990). So weist das CFDV-Konstrukt pRT CF4 eine bis zu 60-fach höhere Aktivität in E. coli als der CaMV 35S-Promotor auf. Aufgrund dieser Aktivität eignen sich die erfindungsgemäßen CFDV-Promotoren auch für den Einsatz in bakteriellen Systemen, beispielsweise zur Herstellung von pharmakologisch aktiven Proteinen oder Peptiden.

Weitere Untersuchungen deuten auf eine gleichfalls hohe Aktivität dieser CFDV-Fragment-Promotoren in Hefen und Pilzen hin.

Gleichfalls Gegenstand der Erfindung sind DNA-Fragmente, die von den vorstehend definierten CFDV-Fragmenten durch Substitution, Deletion, Insertion oder Modifizierung von einzelnen Nukleotiden oder kleineren Gruppen von Nukleotiden abgeleitet sind und die eine vergleichbare Promotoraktivität wie die Ausgangsfragmente aufweisen, sowie deren Verwendung als Promotoren. Als vergleichbare Promotoraktivität kann beispielsweise eine Promotoraktivität angesehen werden, die bis zu 20% über oder unter derjenigen des Ausgangsfragments liegt.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind transformierte Pflanzen-, Bakterien- und Hefezellen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Fragmente erhalten wurden.

Die Figuren zeigen in:

Fig. 1: die schematische Struktur der CFDV-DNA mit 6 möglichen offenen Leserastern (ORF1-6) und der sogenannten „stem-loop“-Struktur. Der Pfeil weist auf die *XhoI*-Schnittstelle hin.

- Fig. 2: die sogenannte „stem-loop“-Struktur; sie zeigt Homologie zu einer ähnlichen Struktur im Genom von Geminiviren und ist vermutlich für die Replikation des Virus verantwortlich.
- Fig. 3: die schematische Anordnung möglicher Signale für die Transkriptions-Regulation auf der durch Schnitt an der *XhoI*-Schnittstelle linearisierten CFDV-DNA. Die Pfeile kennzeichnen die größeren offenen Leseraster ORF1, ORF2, ORF3 und ORF4 auf der CFDV-DNA. Die mit TATAA gekennzeichnete Stelle umfaßt eine mögliche TATA-Box, die zwei Pfeilköpfen zugeordnete Abkürzung RPT weist auf eine wiederholte Sequenz hin; die „stem-loop“-Struktur ist mit SL gekennzeichnet.
- Fig. 4: die Sequenz der zwei wiederholten Sequenzen (RPT) und deren Anordnung als stabile „stem-loop“-Strukturen mit der üblichen CGAAG-loop-Sequenz.
- Fig. 5: eine schematische Darstellung der Lage von für Konstrukte zur Bestimmung der Promotorstärke verwendeten verschiedenen CFDV-Fragmenten auf der durch Schnitt an der *XhoI*-Schnittstelle linearisierten CFDV-DNA. Die Pfeilköpfe zeigen die Lage der zwei direkt wiederholten Sequenzen (RPT) oberhalb eines 52 bp-Elements (schwarzer Kasten) an. Dieses Element zeigt 70% Sequenzidentität zwischen CoYMV und CFDV. Die Pfeile kennzeichnen größere offene Leseraster in den drei Leserastern 1, 2 und 3 (ORF1, ORF2, ORF3) der CFDV-DNA. Die Abkürzung TATAA weist auf eine mögliche TATA-Box hin, die Lage der „stem-loop“-Struktur ist gleichfalls angegeben. *XhoI*, *AflIII*



und StyI kennzeichnen die Lage von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Von den schematisch dargestellten CFDV-Fragment-Promotoren sind die mit pRT CF2, pRT CF3, pRT CF4 und pRT CF5 bezeichneten Fragmente erfindungsgemäße DNA-Fragmente. Zu Vergleichszwecken aufgeführt sind die nicht erfindungsgemäßen CFDV-Konstrukte pRT CF7, pRT CF8, pRT CF9 und pRT CF10, die zwar sämtlich noch die TATAA-Box enthalten, jedoch am 3'-Ende der CFDV-Sequenz derart deletiert sind, daß eine Ausbildung der „stem-loop“-Struktur nicht mehr möglich ist. Gleichfalls Vergleichszwecken dienen das in dem deutschen Patent P 43 06 832 offenbarte, nicht erfindungsgemäße Konstrukt pRT Xho/Sty, das den Translationsstart des offenen Leserasters ORF1 mit umfaßt, und das mit 35S bezeichnete entsprechende CaMV 35S-Konstrukt.

Fig. 6: die schematische Struktur des Ausgangsplasmids pRTsynLUC.

Untersuchungen zur Promotorstärke verschiedener CFDV-Fragmente  
in Pflanzen und Bakterien

Für Untersuchungen zur Promotorregion und -stärke durch die transiente Expression in Pflanzenzellen und Bakterien wurden Fragmente der CFDV-DNA ausgehend von einem CFDV-Konstrukt voller Länge (Rohde et al., Plant Mol. Biol. 27: 623-628, 1995) zunächst mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und als subgenomische Fragmente in dem Plasmidvektor pRT2synGUSΔH in transkriptionelle Fusion zum Gen der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) gebracht. Die erhaltenen Plasmide wurden in Experimenten zur transienten Expression mit einem entsprechen-

den CaMV 35S-Konstrukt sowie mit Konstrukten mit nicht erfindungsgemäßen CFDV-DNA-Fragmenten verglichen.

Sämtliche nachfolgend aufgeführten Verfahrensschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, entsprechend Standardverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA (1989) beschrieben werden, ausgeführt.

#### Anwendungsbeispiel

##### I. Herstellung der CFDV-Fragment-GUS-Konstrukte für die transiente Expression

Als Ausgangsplasmid diente das CFDV-Konstrukt voller Länge, das in Rohde et al., Plant Mol. Biol. 27: 623-628, 1995 beschrieben wurde. Mit Hilfe spezifischer Primer, die zusätzliche Restriktionsschnittstellen enthielten, und zwar *HindIII* für das 5'-Ende und *NcoI* für das 3'-Ende der amplifizierten DNA-Moleküle, wurde das CFDV-Genom amplifiziert. Entsprechend der Wahl der Primer wurden hinsichtlich ihrer Länge festgelegte CFDV-Fragmente erhalten. Die Primer wurden anhand der von W. Rohde et al. in Virology 176: 648-651, 1990 beschriebenen Nukleotidsequenz des CFDV-Virus und zwar genauer anhand der Nukleotidsequenzen im Bereich der 5'- bzw. 3'-Enden des gewünschten Fragments synthetisiert, um durch die spätere DNA-Amplifikation die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführten CFDV-Fragmente zu gewinnen. Die Primer waren zusätzlich um DNA-Abschnitte ergänzt, die die vorstehend genannten zusätzlichen Restriktionsschnittstellen enthielten.

Die Amplifikationsprodukte wurden mit *HindIII*/*NcoI* verdaut, die Spaltungsprodukte in einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente durch Elektroelution isoliert.

Die CFDV-Fragmente wurden dann in den Vektor pRT2synGUSAH

ligiert, der vorab aus dem Plasmid pRTsynLUC (Fig. 6; Turner et al., Arch. Virol. 137: 123-132, 1994) hergestellt worden war. Dazu wurde das Luziferase-Gen durch *NcoI*/*BamHI*-Verdau entfernt und durch das GUS-Gen mit *NcoI*/*BamHI*-Enden ersetzt. Schließlich wurde die *HindIII*-Schnittstelle am 35S 3'-Ende deletiert, indem das Plasmid partiell mit *HindIII* geschnitten, die Schnittstelle aufgefüllt und das lineare Molekül durch Religation zu pRT2synGUSΔH zirkularisiert wurde. Anstelle der *HindIII*-Schnittstelle wurde so eine *NheI*-Schnittstelle geschaffen. Der 35S-Promotor wurde aus diesem Plasmid durch *HindIII*/*NcoI*-Verdau entfernt und durch die entsprechenden *HindIII*/*NcoI*-CFDV-Fragmente ersetzt.

Die in den erzeugten CFDV-Fragment-GUS-Konstrukten als Promotoren enthaltenen CFDV-Fragmente sind hinsichtlich ihrer exakten Lage auf der CFDV-DNA in Tabelle 1 aufgeführt und schematisch in Figur 4 gezeigt. Die in Tabelle 1 angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf eine durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* linearisierte CFDV-DNA, deren 5'-Ende die Position 1 zugewiesen wurde. Zur Ergänzung wurden auch die entsprechenden DNA-Abschnitte für die „stem-loop“-Struktur, die offenen Leseraster ORF1 und ORF2 und weitere Strukturelemente der CFDV-DNA aufgenommen.

Die in Tabelle 1 enthaltenen und in Figur 4 schematisch dargestellten, mit pRT CF2 - 5 bezeichneten CFDV-Fragmente sind erfindungsgemäße CFDV-Fragmente. Bei den mit pRT CF7-10 bezeichneten CFDV-Fragmenten handelt es sich um nicht erfindungsgemäße Fragmente von CFDV, da diese zwar noch die TATAA-Box umfassen, jedoch bei diesen die CFDV-Sequenz an ihrem 3'-Ende derart deletiert ist, daß eine Ausbildung der „stem-loop“-Struktur nicht mehr möglich ist.

TABELLE 1

KONSTRUKT	5'-Ende des CFDV-Fragments	3'-Ende des CFDV-Fragments
pRT CF2	211	991
pRT CF3	409	991
pRT CF4	611	991
pRT CF5	711	991
pRT CF7	211	962
pRT CF8	409	962
pRT CF9	611	962
pRT CF10	711	962
pRT XhoI/StyI	1	1157
RPT1	655	676
RPT2	682	701
52 bp-Sequenz	734	785
TATA-Box	934	939
SL	941	971
ORF1	1004	583
ORF2	1215	383

Die gleichfalls zu Vergleichszwecken eingesetzten Konstrukte pRT CF XS und pRT 35S, die das GUS-Reportergen in Verbindung mit dem XhoI/StyI-Fragment des CFDV-Virus (Tabelle I) bzw. dem CaMV 35S-Promotor enthalten, wurden, wie in dem deutschen Patent P 43 06 832 beschrieben, hergestellt.

## II. Transiente Expression von CFDV-Fragment-GUS-Konstrukten in Tabak-Protoplasten

### II.1. Protoplastenmedien

K3:	Makroelemente:	Mikroelemente:
	25 mM $\text{KNO}_3$	100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$
	1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	130 $\mu\text{M}$ $\text{MnSO}_4$
	6 mM $\text{CaCl}_2$	40 $\mu\text{M}$ $\text{ZnSO}_4$
	3 mM $\text{NH}_4\text{NO}_3$	5 $\mu\text{M}$ $\text{KCl}$
	1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$
	1 mM $\text{MgSO}_4$	1 $\mu\text{M}$ $\text{CoCl}_2$
	Eisen in EDTA:	Vitaminlösung:
	1 $\mu\text{M}$ $\text{FeSO}_4$	270 $\mu\text{M}$ Glycin
	1 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{EDTA}$	160 $\mu\text{M}$ Nicotinsäure
		100 $\mu\text{M}$ Pyridoxin
		3 $\mu\text{M}$ Thiamin
	Kohlenhydrate:	Hormone:
	400 mM Saccharose	5,5 $\mu\text{M}$ NAA
	1,7 mM Xylose	1,0 $\mu\text{M}$ Kinetin
	0,5 mM Inosit	

pH 5,6 osmotischer Wert: 600 mOs

W5:	150 mM $\text{NaCl}$
	125 mM $\text{CaCl}_2$
	5 mM $\text{KCl}$
	5 mM Glucose

pH 5,6 - 6,0

MaMg: 450 mM Mannitol  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 % MES

pH 5,6

## II.2. Herstellen von Tabak-Protoplasten

(Vgl. I. Negrutiu et al., „Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of Nicotiana plumbagenifolia, viviani“, Theor. Appl. Genet. 72: 279-286, 1987).

Blätter (10 g) von in Gewebekultur herangezogenen Nicotiana tabacum-Pflanzen (var. SR1) wurden in 100 ml Enzymlösung für 16 h bei 25°C im Dunkeln inkubiert und die erhaltenen Protoplasten durch Siebe (Maschenweite 100 µm) von groben Geweberesten abgetrennt. Die weitere Aufreinigung der Protoplasten erfolgte durch wiederholte Zentrifugationen und Waschen mit K3-Medium, wobei sich die vitalen Protoplasten jeweils an der Oberfläche konzentrierten, sowie schließlich durch Resuspension in W5-Medium und Sedimentation durch Zentrifugation. Das Protoplasten-Sediment wurde in MaMg-Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 10<sup>6</sup>/ml eingestellt.

## II.3. Transformation von Protoplasten

(vgl. C. Maas und W. Werr: „Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA-transfection into plant protoplasts“, Plant Cell Rep. 8: 148-151, 1989).

Zu jeweils 500 µl Protoplasten wurden 15 µl Plasmid/Carrier-DNA (entsprechend 10 µg CFDV-Fragment-GUS-Konstrukt- bzw. CaMV35S-GUS-Plasmid-DNA und 50 µg Kalbsthymus-DNA) gegeben, die Suspension für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach vorsichtig mit PEG-Lösung (40% PEG 4000, 0,1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,4 M Mannitol) unterschichtet und sofort geschwenkt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach weiterer 30-minütiger Inku-

bation erfolgte die Zugabe von 4 ml K3-Medium (mit Antibiotikum und Kinetinen) und die einzelnen Transformationsansätze wurden für 20 h bei 25°C im Dunkeln gehalten.

#### II.4. Analyse der Protoplasten-Transformationen

Die Protoplasten-Ansätze wurden nach 20 h mit W5-Medium auf 10 ml aufgefüllt, zentrifugiert, die sedimentierten Protoplasten nach Resuspension in 1 ml W5-Medium erneut abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Bestimmung von Proteinmenge und GUS-Enzymaktivität mörserte man die Protoplasten in 50 µl GUS-Extraktionspuffer und bestimmte die GUS-Aktivität fluorimetrisch mit 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (4-MUG; vgl. R.A. Jefferson: „Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system“, Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405, 1987). Hierzu wurde mit 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (4-MUG) 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proteinmenge wurde nach Bradford bestimmt (vgl. M. Bradford: „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding“, Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976).

Die für die einzelnen Konstrukte erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt. Die Ergebnisse in Tabelle 2 sind angegeben als Prozentsatz an Aktivität der einzelnen CFDV-Konstrukte bezogen auf diejenige des CaMV 35S-Promotor-Konstrukts (pRT 35S), die zu 100% gesetzt wurde. Es werden die Ergebnisse von zwei oder drei unabhängigen Experimenten wie auch der Mittelwert aus diesen Ergebnissen angegeben. Das Konstrukt pRT CF XS enthält das in dem deutschen Patent P 43 06 832 offenbarte, nicht erfindungsgemäße Fragment, das durch die Spaltung der CFDV-DNA mittels der Restriktionsendonukleasen XhoI und StyI erhalten wird und zusätzlich den Translationsstart des offenen Leserasters ORF1 mit umfaßt.

TABELLE 2

Konstrukt	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Mittelwert
pRT CF2	-	48	67	57,5
pRT CF3	20	-	21	20,5
pRT CF4	204	59	36	118
pRT CF5	25	30	18,9	24,6
pRT CF7	0	0	-	0
pRT CF8	0	0	-	0
pRT CF9	0	0	-	0
pRT CF10	0	0	-	0
pRT CF XS	9	0,8	1,2	3,6
pRT 35S	100	100	100	100

Wie die in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, weisen die erfindungsgemäßen CFDV-Fragmente eine deutlich höhere Promotoraktivität in Tabak-Protoplasten als der *XhoI/StyI*-CFDV-Fragment-Promotor des Konstrukts pRT CF XS auf, der zusätzlich den Translationsstart des offenen Leserasters ORF1 enthält und in dem deutschen Patent P 43 06 832 beschrieben worden ist.

Die nicht erfindungsgemäßen Konstrukte pRT CF7 - 10 zeigen in Tabak-Protoplasten keinerlei Aktivität, was zeigt, daß die Möglichkeit der Ausbildung der „stem-loop“-Struktur im Bereich der Nukleotide 941 bis 971 in dem CFDV-Fragment-Promotor für die Promotoraktivität essenziell ist.

Das erfindungsgemäße Konstrukt pRT CF4 zeigt in Tabak-Protoplasten darüberhinaus eine vergleichbare Promotoraktivität wie der CaMV 35S-Promotor (vgl. Konstrukt pRT 35S).



### III. Transiente Expression von CFDV-Fragment-GUS-Konstrukten in *E. coli*

#### III.1. Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* JM109-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmid-DNAs durch Elektroporation transformiert und auf LB-Platten (unter Zusatz von Ampicillin) selektioniert.

#### III.2. Analyse der *E. coli*-Transformationen

Man ließ einzelne Kolonien in 2 ml LB-Medium (unter Zusatz von Ampicillin) über Nacht hochwachsen. Je 10  $\mu$ l Bakteriensuspension wurden mit 35  $\mu$ l Extraktionspuffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7; 10 mM EDTA; 0,1% Triton X-100) aufgeschlossen, mit 5  $\mu$ l 10x 4-MUG-Lösung (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid; vgl. R.A. Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405, 1987) versetzt und bei 37°C 10 min oder für die Messung des Zeitverlaufs der GUS-Aktivität 10 min, 20 min oder 47 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer gestoppt und die GUS-Aktivität mit 4-MUG fluorimetrisch bestimmt. Die Proteinmenge wurde nach Bradford (vgl. M. Bradford, Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976) bestimmt.

Die für die einzelnen Konstrukte erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 3A und 3B aufgeführt. Die Ergebnisse in Tabelle 3A sind angegeben als Prozentsatz an Aktivität bezogen auf die Aktivität des CFDV-Promotor-Konstrukts pRT CF4, die als die insgesamt höchste in diesem Beispiel erzielte Promotoraktivität zu 100% gesetzt wurde. Es werden die Ergebnisse von zwei oder drei unabhängigen Experimenten sowie der Mittelwert aus diesen Ergebnissen angegeben. Die in Tabelle 3B in der jeweils rechten Spalte für die einzelnen Inkubationsdauern angegebenen Prozentangaben geben den Prozentsatz an Aktivität bezogen auf diejenige des CFDV-Promotorkonstrukts pRT CF4 ent-

sprechend den in den jeweils linken Spalten aufgeführten Absolutwerten für ausgewählte Konstrukte wieder.

TABELLE 3A

KONSTRUKT	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Mittelwert
pRT CF2	4,4	15,8	17,1	12,4
pRT CF3	5,7	14,0	12,6	10,7
pRT CF4	100	100	100	100
pRT CF5	5,1	14,9	-	10,0
pRT CF XS	6,6	20,8	15,9	14,4
pRT 35S	3,6	11,3	8,6	7,8

TABELLE 3B

KONSTRUKT	10 min		20 min		47 min	
	Inkubation		Inkubation		Inkubation	
pRT CF4	35.560	100	78.900	100	407.400	100
pRT CF5	1.396	3,9	2.900	3,6	12.980	3,2
pRT CF XS	2.040	5,7	4.820	6,1	37.400	9,2
pRT 35S	1.222	3,4	1.766	2,2	6.820	1,7

Die in Tabelle 3A aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß sämtliche erfindungsgemäßen CFDV-DNA-Fragmente auch in Bakterien als Promotor aktiv sind und eine höhere Aktivität als der CaMV 35S-Promotor (vgl. Konstrukt pRT 35S) zeigen. Gegenüber dem Konstrukt pRT CF4, das als Promotor ein CFDV-DNA-Fragment enthält, das die wiederholten Strukturen (RPT), die 52 bp-Sequenz, die TATAA-Sequenz und die „stem-loop“-Struktur im Bereich der Nukleotide 941 bis 971 umfaßt, jedoch keinerlei DNA-Abschnitte der offenen Leseraster ORF1, ORF2 und auch ORF3 enthält, zeigt das Konstrukt pRT 35S mit dem CaMV 35S-Promotor nur weniger als 10% von dessen Aktivität.

### PATENTANSPRÜCHE

1. CFDV-Virus-DNA-Fragment,  
das die „stem-loop“-Struktur, nicht jedoch den oder die  
Translationsstart(s) für die offenen Leseraster ORF1 und/oder  
ORF2 umfaßt.
2. CFDV-Virus-DNA-Fragment nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß es die wiederholten RPT-Strukturen,  
die 52 bp-Sequenz und die TATAA-Sequenz zusätzlich zu der  
„stem-loop“-Struktur umfaßt.
3. CFDV-Virus-DNA-Fragment nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es die Nukleotide 211 bis 991, 409 bis 991, 611 bis 991  
oder 711 bis 991 umfaßt, wobei für die Nummerierung der  
Nukleotide dem 5'-Ende der aus der Spaltung der zirkulären  
CFDV-DNA mit der Restriktionsendonuklease XhoI resultierenden  
linearisierten DNA die Position 1 zugewiesen worden ist.
4. DNA-Fragment,  
das von einem der CFDV-Virus-DNA-Fragmente nach einem der  
Ansprüche 1 bis 3 durch Substitution, Deletion, Insertion oder  
Modifizierung von einzelnen Nukleotiden oder kleineren Gruppen  
von Nukleotiden abgeleitet ist und eine vergleichbare  
Promotoraktivität wie das Ausgangsfragment aufweist.
5. Verwendung eines oder mehrerer DNA-Fragmente nach einem  
der Ansprüche 1 bis 4 als Promotor.

6. Verwendung eines oder mehrerer DNA-Fragmente nach Anspruch 5 als Promotor in Bakterien oder Hefen.
7. Verwendung eines oder mehrerer DNA-Fragmente nach Anspruch 5 als Promotor zur gewebespezifischen Expression von Genen in transgenen Pflanzen.
8. Verwendung eines oder mehrerer DNA-Fragmente nach Anspruch 7 zur phloemspezifischen Expression von Genen in transgenen Pflanzen.
9. Verwendung eines oder mehrerer DNA-Fragmente nach einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung von chimären Konstrukten zur transienten und stabilen Expression.
10. Transgene Pflanzen, Pflanzenteile, transformierte Pflanzen-, Hefe- oder Bakterienzellen, die unter Verwendung einer DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 4 erhalten worden sind.

1/4

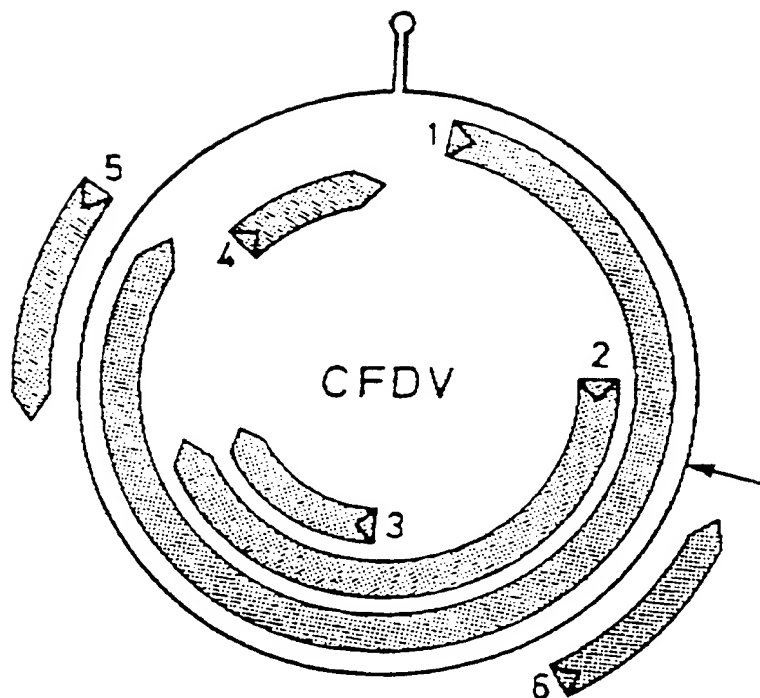


FIG. 1

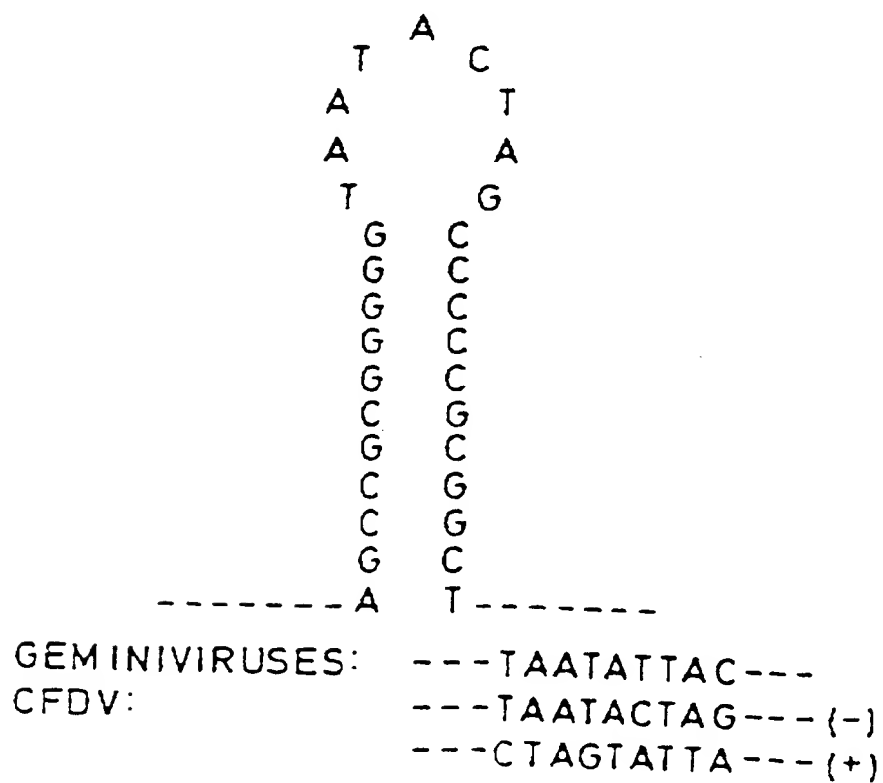


FIG. 2



2/4

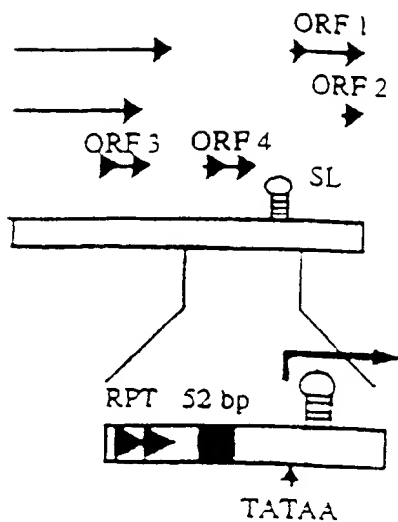


FIG. 3

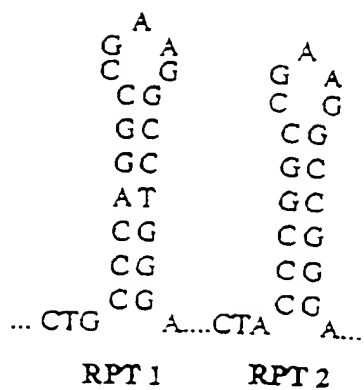


FIG. 4



7

•



3 / 4

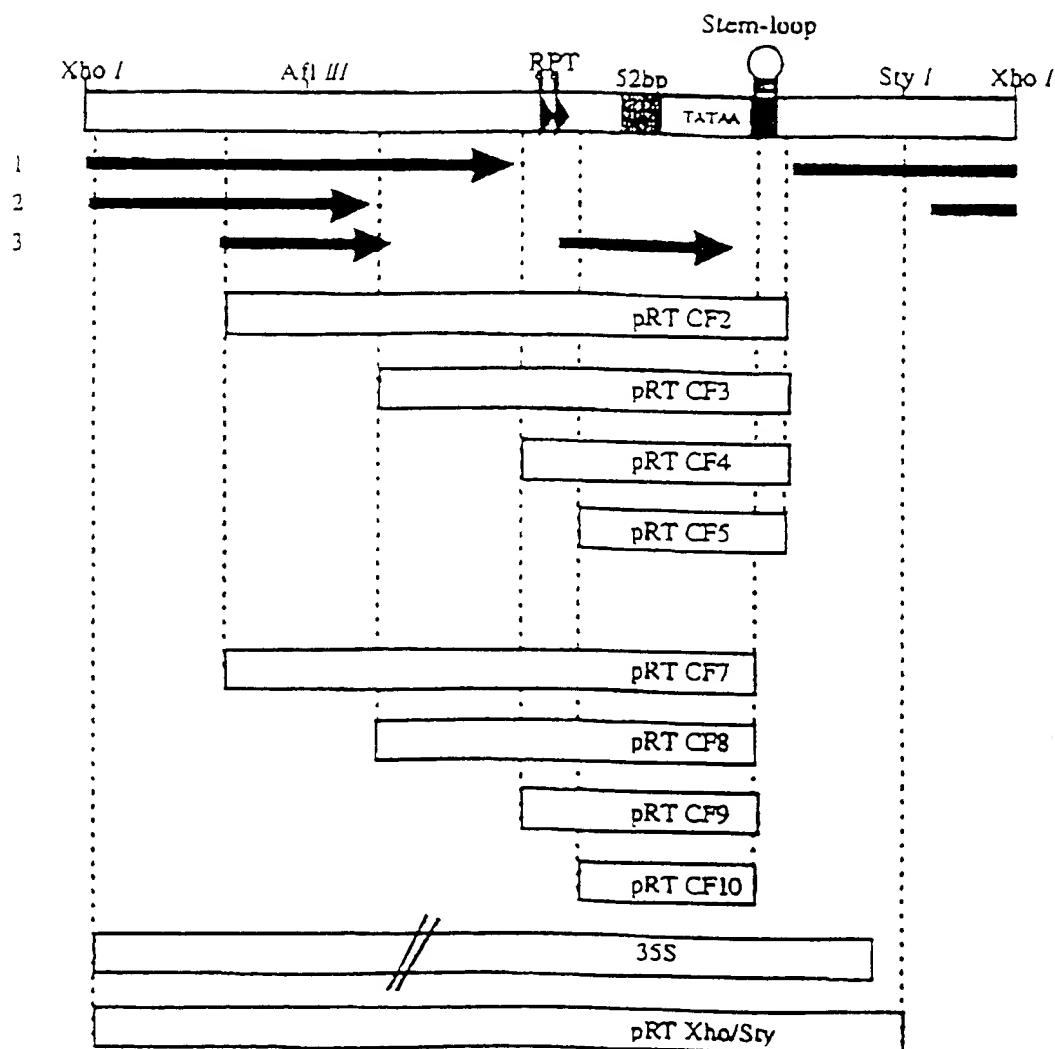


FIG. 5



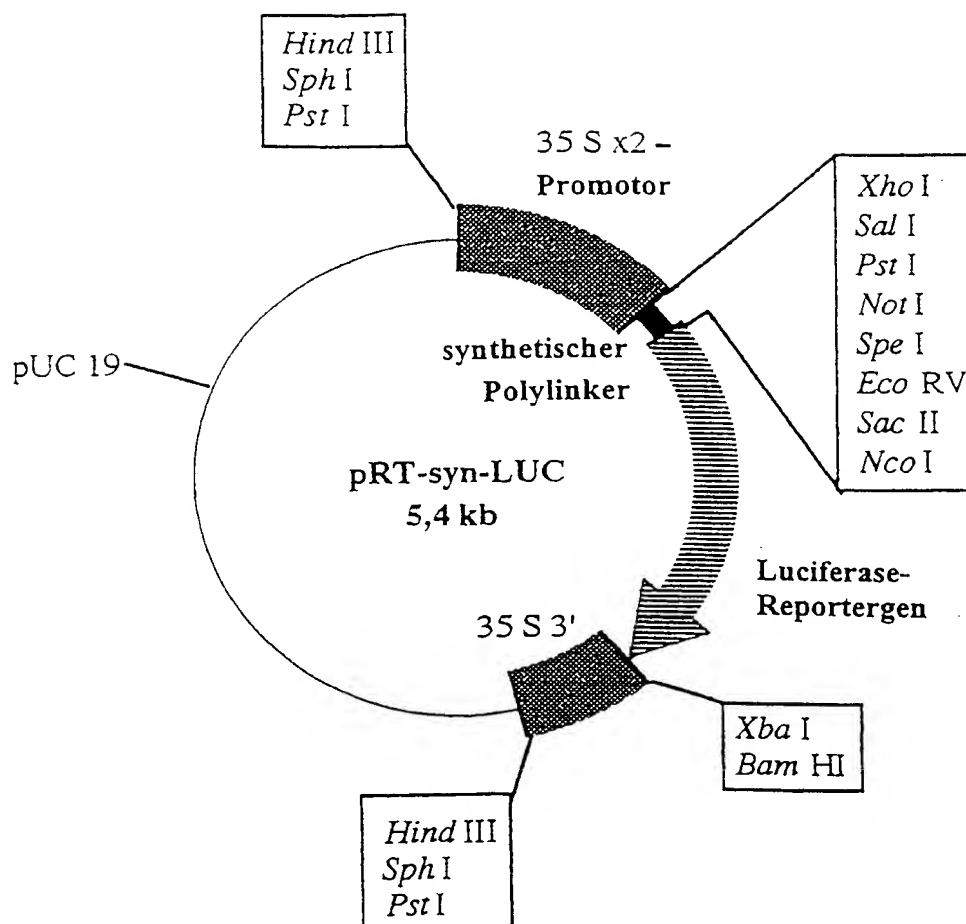


FIG. 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/04346

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/11 C12N5/10 C12N1/19 C12N1/21  
A01H1/00 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	HEHN, A. UND ROHDE, W.: "Characterization of cis-acting elements affecting strength and phloem specificity of the coconut foliar decay virus promoter" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 79, June 1998, pages 1495-1499, XP002085438 see the whole document	1-10
X	ROHDE, W. ET AL.: "The promoter of coconut foliar decay-associated circular single-stranded DNA directs phloem-specific reporter gene expression in transgenic tobacco" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 27, 1995, pages 623-628, XP000677848 cited in the application	1-3, 5, 7-10
Y	see the whole document	4
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 1998

Date of mailing of the international search report

08/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No.

PCT/EP 98/04346

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 43 06 832 C (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN EV) 24 February 1994 cited in the application	1-3, 5, 7-10
Y	see page 5, line 1 - page 6, line 55; figure 3A	4
A	<p style="text-align: center;">---</p> ROHDE, W. ET AL.: "Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus" VIROLOGY, vol. 176, 1990, pages 648-651, XP002085439 cited in the application see the whole document <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04346

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4306832	C	24-02-1994	NONE

